

Publication number : JP1996-A-027018

Date of publication of application : 30.01.1996



AK

## MEDICINAL COMPOSITION CONTAINING PHYSIOLOGICALLY ACTIVE PEPTIDE OR PROTEIN

### Abstract:

**PURPOSE:** To enhance the activities of a physiologically active substance, improve the safety for enzymes and sustain effects by using a fatty emulsion having the negatively regulated surface charge as a carrier for a physiologically active peptide, a protein or a derivative thereof.

**CONSTITUTION:** This medicinal composition is obtained by using a fatty emulsion having the negatively regulated surface charge in a system comprising a physiologically active peptide, a protein or a derivative thereof and has various functions imparted thereto. The physiologically active basic peptide can be bound to the basic protein at a high ratio by negatively regulating the surface charge of the fatty emulsion as a carrier. The release and distribution of the peptide and the protein can be controlled by the amount of a charge regulator. The composition is improved in the stability of the peptide and protein to enzymes to manifest excellent properties such as enhancement of the pharmacological effects and prolongation, etc., of duration. The charge regulator for the fatty emulsion is preferably selected from an acidic phospholipid, its salt, a fatty acid, its salt, bile acid and its salt. Motilin, a vasoactive intestinal polypeptide(VIP), calcitonin, etc., are preferred as the physiologically active substance.

**BEST AVAILABLE COPY**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-27018

(43) 公開日 平成8年(1996)1月30日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 38/00				
9/107	E			
38/22				

A 6 1 K 37/ 02

37/ 24

審査請求 未請求 請求項の数3 O L (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平6-171070	(71) 出願人	000144577 株式会社三和化学研究所 愛知県名古屋市東区東外堀町35番地
(22) 出願日	平成6年(1994)7月22日	(72) 発明者	佐藤 誠 愛知県名古屋市東区東外堀町35番地 株式 会社三和化学研究所内
		(72) 発明者	幸崎 敏之 愛知県名古屋市東区東外堀町35番地 株式 会社三和化学研究所内
		(72) 発明者	石原 容子 愛知県名古屋市東区東外堀町35番地 株式 会社三和化学研究所内
		(74) 代理人	弁理士 佐々木 功 (外1名) 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生理活性ペプチド又は蛋白質を含有する薬剤組成物

(57) 【要約】

【目的】 生理活性ペプチド又は蛋白質を含有する薬剤組成物を提供する。

【構成】 表面電荷を負に調整した脂肪乳剤と、生理活性塩基性ペプチド、塩基性蛋白質又はこれらの誘導体を含有している。

【効果】 生理活性ペプチド、蛋白質又はこれらの誘導体のキャリアーとして電荷調整脂肪乳剤を採用した結果、生理活性物質の吸着率が著しく増加し、活性が増強し、酵素に対する安定性が向上し、更に薬理効果の持続時間が延長する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 表面電荷を負に調整した脂肪乳剤と、生理活性塩基性ペプチド、塩基性蛋白質又はこれらの誘導体とを含有していることを特徴とする、薬剤組成物。

【請求項2】 脂肪乳剤用の電荷調整剤として酸性磷脂質、その塩、脂肪酸、その塩、胆汁酸及びその塩から選択された少なくとも1種類の物質を含有していることを特徴とする、請求項1に記載の薬剤組成物。

【請求項3】 生理活性物質がモチリン、VIP、カルシトニン、これらのアナログ及び誘導体から選択された物質であることを特徴とする、請求項1又は2に記載の薬剤組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は生理活性ペプチド又は蛋白質を含有する薬剤組成物に係り、殊に表面電荷が調整された脂肪乳剤に結合乃至組み合わされた生理活性塩基性ペプチド、塩基性蛋白質又はそれらの誘導体を含有する薬剤組成物に係る。

## 【0002】

【従来の技術及びその課題】近年、各種の生理活性物質を脂肪乳剤として調製することにより、その薬理作用を高める試みが数多くなされてきた。例えば、ステロイド類（特開昭56-167616）、プロスタグランジン類（特開昭59-216820）、抗癌剤（特開昭56-167616）等についての脂肪乳剤が提案されており、その薬理作用の増強も一応認められている。しかしながら、脂肪乳剤は水溶性の薬物に適用し難いと言う課題を有しており、脂溶性の低い薬物には脂溶性官能基を導入する方法や（特開昭56-167616）、油相にエイゾン等の薬物溶解性の高い物質を混入させる方法が提案されている（特開昭61-263914）。

【0003】一般に、生理活性ペプチド及び蛋白質は脂溶性に乏しく、上述の方法によって脂肪乳剤に封入することは不可能であり、又単純に混合吸着させてもその吸着率は低く剥離し易いため脂肪乳剤の表面に化学的に共有結合させる方法が検討されている（特開昭62-284000）。

【0004】脂肪乳剤を薬物のキャリアーとして利用することにより、薬物に各種の機能例えば物性の改善（安定性や分散性の向上、刺激性低下等）や臓器・組織へのターゲティング性等を付与し、斯くて薬物の活性を充分に発揮させるためには薬物を脂肪乳剤に溶解、吸着或いは結合させ且つ薬物の放出を制御する必要性がある。薬物の脂肪乳剤への溶解、吸着或いは結合及び薬物の放出制御は脂肪乳剤の油相成分（例えば大豆油）或いは界面成分（例えば卵黄レシチン）と水相（生体内においては例えば血液）との分配によって決定される。従来の技術は、この薬物の分配を薬物の脂溶性により制御してきた。即ち、従来の方法は、①脂肪乳剤の成分を選択する

ことにより（薬物の脂溶性になるべく適合する成分を選択）薬物の分配を制御する方法並びに②薬物自体を化学修飾することにより脂溶性を変化させて薬物の分配を制御する方法である。これらの方法の内、①の方法は脂肪乳剤としての形態を保持させる成分が限定され、適応しうる薬物も限定され、更にペプチド等の親水性薬物には全く適応できない点に課題があり、一方②の方法は或る程度の制御は可能であるが、薬物の修飾と修飾による薬物の性状変化（活性、毒性等）の評価に多大な労力を必要とし、又修飾した結果薬物の活性が低下又は消失する場合がある点に課題がある。殊にペプチドや蛋白質に関して脂溶性の増大を目的とした化学修飾において著しい活性の低下が報告されており[Muranisi, S. "Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.", Vol. 19, pages 212 - 213 (1992)], 脂肪乳剤への溶解、吸着或いは結合及び薬物の放出制御は一部の薬物に関してのみ可能であるに過ぎない。

## 【0005】

【発明の目的】従って、本発明の目的は、従来技術における上記の事情に鑑みて親水性薬物、殊に生理活性ペプチド及び蛋白質の性状に影響を与えることなく脂肪乳剤に適用することにより各種の機能を付与した薬剤組成物を提供することにある。

## 【0006】

【課題を解決し、目的を達成する手段及び作用】本発明者等は、鋭意研究の結果、脂肪乳剤の表面電荷を負に調整することにより高率を以て生理活性塩基性ペプチド及び塩基性蛋白質を結合させ得ること、電荷調整剤の量によりペプチド及び蛋白質の放出・分配を制御し得ること、この表面電荷調整脂肪乳剤をキャリアーとする本発明による組成物は、ペプチド及び蛋白質の対酵素安定性が向上し、更には薬理効果の増強と持続時間の延長がもたらされることを見い出して本発明を完成するに至った。

【0007】電荷調整剤としては各種の酸性磷脂質及びその塩、各種の脂肪酸類及びその塩、胆汁酸類及びその塩から選択された少なくとも1種類の物質が使用される。酸性磷脂質及びその塩は特に限定されないがホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジン酸及びその塩を例示することができる。脂肪酸類及びその塩も特に限定されないが、炭素数6以上の脂肪酸及びその塩が好ましい。胆汁酸類及びその塩も特に限定されないがデヒドロコロール酸、デオキシコロール酸、タウロコロール酸及びその塩を例示することができる。

【0008】生理活性塩基性ペプチド、塩基性蛋白質及びこれらの誘導体は特に限定されないがモチリン、VIP、グルカゴン、カルシトニン等の塩基性ペプチドや塩基性蛋白質及びそのアナログやそれらの誘導体を例示することができる。

【0009】電荷調整剤含有脂肪乳剤は、電荷調整剤の添加を除けば従来知られている任意の処方及び方法により調製することができる。例えば、全体の50% (W/V) までの油脂 (例えば単純脂質) と油脂に対し重量比で0.1 - 2.4 の乳化剤 (例えば磷脂質)、必要量の電荷調整剤及び必要であれば乳化助剤、安定化剤等を添加し、加熱或いは溶媒留去等の手段により均一に混合し、適量の水及び必要に応じて pH 調整剤、等張化剤を添加し、通常ホモジナイザー等により均質化することにより調製することができる。電荷調整剤の添加量は適宜設定されるが、酸性磷脂質の場合、乳化剤に対して最高 100mol% まで、即ち乳化剤をすべて酸性磷脂質とすることができる。その他の電荷調整物質の場合には、乳化剤に対して最高 50mol% までは添加することができる。

【0010】塩基性ペプチド及び塩基性蛋白質の脂肪乳剤への結合は、塩基性ペプチド及び塩基性蛋白質の等電点以下の pH にて電荷調整脂肪乳剤と混合し放置するだけで行われる。

【0011】

【実施例等】次に、本発明による薬剤組成物の製造例及び各種の試験例に関連して本発明を更に詳細に且つ具体的に説明する。

#### 試験例を兼ねる製造例 1

下記の表 1 に示される電荷調整剤 0.4g と、精製卵黄レシチン 1.6g と、大豆油 8.0g とをクロロホルム/メ \*

\* タノール (5/1, V/V) 混液 50ml 中で混合溶解した後、ロータリーエバポレーターにより減圧下に溶媒を完全に除去する。これに注射用蒸留水 90g を添加し、ホモミキサーにて攪拌し (10000rpm) 粗乳化液とする。この粗乳化液をマイクロフルイタイザーにより高圧 (1500kg/cm<sup>2</sup>) 乳化し、10% (W/W) 脂肪乳剤を得た。出願人会社にて調製したモチリンアナログ ([Leu<sup>13</sup>]-motilin-Hse, アミノ酸配列: Phe-Val-Pro-Ile-Phe-Thr-Try-Gly-Glu-Leu-Gln-Arg-Leu-Gln-Glu-Lys-Glu-Arg-Asn-Lys-Gly-Gln-Hse) の水溶液と上記の脂肪乳剤とを混合し、水酸化ナトリウムにて pH を 7 に調整し、更に塩化ナトリウムにてイオン強度を 0.308 に調整することにより、最終成分濃度が 1% 脂肪乳剤、50μg/ml モチリンアナログである薬剤組成物を得た。予めモチリンアナログ溶液にて吸着が飽和状態になされた限外濾過膜 (分画分子量: 3000) により、上記の調製された各薬剤組成物を限外濾過して濾液中のモチリンアナログ (非吸着体) 濃度を定量することにより脂肪乳剤に吸着したモチリンアナログ量を求めた。結果は下記の表 1 に示されている通りであり、電荷調整剤を添加していない一般の脂肪乳剤 (対照) と比較する場合に、電荷調整剤を添加したすべての脂肪乳剤は 80% 以上の高いモチリンアナログ吸着率を示した。

【0012】

【表 1】

電 荷 調 整 剤	モチリンアナログの吸着率 (%)
ジミリスチルホスファチジル グリセロール (ナトリウム塩)	100
ジミリスチルホスファチジン酸 (ナトリウム塩)	100
ホスファチジルイノシトール (ナトリウム塩)	100
ホスファチジルセリン	100
オレイン酸	82.3
カプリン酸ナトリウム	93.1
対照 (電荷調整剤無添加)	13.0

#### 【0013】試験例を兼ねる製造例 2

下記の表 2 に示される油脂 8.0g と、乳化剤としての水素添加大豆ホスファチジルコリン 1.2g と、電荷調整剤としてのジミリスチルホスファチジルグリセロール (ナトリウム塩) 0.8g とを用い、実施例 1 と同様の操作にて電荷調整脂肪乳剤を調製し、最終成分濃度が 0.1 % 脂肪乳剤、100μg/ml モチリンアナログ (製造例 1

に記載の [Leu<sup>13</sup>]-motilin-Hse) である薬剤組成物を得、脂肪乳剤に吸着したモチリンアナログ量を求めた。結果は下記の表 2 に示されている通りであり、油脂の種類はモチリンアナログの脂肪乳剤への吸着に影響を与えないことが判明した。

【0014】

【表 2】

油 脂	モチリンアナログの吸着率 (%)
大豆油	85.9
中鎖脂肪酸トリグリセリド	86.2
酢酸トコフェロール	86.9
スクワラン	87.3

## 【0015】試験例を兼ねる製造例 3

製造例 2 で調製したスクワランの脂肪乳剤を使用し、出願人会社にて調製したVIP アナログ ([Leu<sup>17</sup>]-VIP-Hse、アミノ酸配列: His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Gly-Asn-Tyr-Thr-Lys-Leu-Arg-Lys-Gln-Leu-Ala-Ala-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Lys-Ala-Leu-Lys-Hse)、この VIP アナログの C 末端をヘキシルアミド化した誘導体及びウナギカルシトニン並びに製造例 2 でも用いたモチリンアナログに関し、イオン強度 0.308、pH 7、成分最終濃度が 0.1% 脂肪乳剤、各種ペプチド及びペプチド誘導体 1\*

\* 00μg/ml である薬剤組成物を調製し、各種ペプチド又はペプチド誘導体の脂肪乳剤への吸着量を求め、又構成アミノ酸に基づいて pH 7 における総電荷量を計算した。結果は下記の表 3 に示されており、使用したペプチド及びペプチド誘導体は製造例 2 で使用したモチリンアナログより総電荷量が高く完全に脂肪乳剤に吸着した。

【0016】

【表3】

ペプチド及び誘導体	総電荷量	吸着率 (%)
VIP アナログ	+ 6.5	100
VIP アナログ・ヘキシルアミド	+ 7.5	100
ウナギカルシトニン	+ 2.5	100
モチリンアナログ	+ 1	87.3

## 【0017】試験例 1

製造例 2 で調製したスクワランの脂肪乳剤のツェータ (ζ) 電位をイオン強度 0.308、pH 3 - 9.5 の条件下において測定した。又、イオン強度 0.308、pH 3 - 9.5 の条件下において最終成分濃度が 0.1% 脂肪乳剤、100μg/ml モチリンアナログ (製造例 1 に記載の [Leu<sup>17</sup>]-motilin-Hse) である薬剤組成物 (製造例 2 参照) について、脂肪乳剤に吸着したモチリンアナログ量を求めた。結果は図 1 及び 2 に示されており、モチリンアナログの場合に、その等電点 (pH 8.6) 以下で且つ脂肪乳剤が負電荷を有する pH 領域においてモチリンアナログの脂肪乳剤への良好な吸着がもたらされることが判明した。

## 【0018】製造例を兼ねる試験例 2

油脂としてのスクワラン 8.0g と、乳化剤としての水素添加大豆ホスファチジルコリン 1.8g と、電荷調整剤としてのジミリスチルホスファチジルグリセロール (ナトリウム塩) 0.2g とを用いて製造例 1 と同様の操作により脂肪乳剤となした。本脂肪乳剤 (処方 A) と電荷調整剤含量が異なる製造例 2 に記載のスクワラン脂肪乳剤 (処方 B) とについて脂肪乳剤の最終濃度を 0.1% に固定し、イオン強度 0.308、pH 7 の条件下にモチリンアナログ (製造例 1 に記載の [Leu<sup>17</sup>]-motilin-Hse) の最終濃度を 50 - 500μg/ml の範囲に設定し、脂肪乳剤に吸着したモチリンアナログ量を求めた。結果は図 3

に示されており、モチリンアナログの脂肪乳剤への吸着には下記の式にて示される Freundlich の吸着平衡が認められた。尚、その吸着量は脂肪乳剤の電荷調整剤含量に依存して増加することが判明した。

$$\log q = (a + b) \log C$$

q : 吸着濃度 (mg/g)

C : 水相濃度 (mg/ml)

a, b : 定数

## 【0019】試験例 3

試験例 2 において使用した電荷調整剤の含量が異なる処方 A 及び処方 B の脂肪乳剤についてモチリンアナログ (製造例 1 に記載の [Leu<sup>17</sup>]-motilin-Hse) の最終濃度を 100μg/ml に固定し、イオン強度 0.308、pH 7 の条件下に脂肪乳剤の最終濃度を 0.1 - 1.0% の範囲に設定し、脂肪乳剤に吸着したモチリンアナログ量を求めた。又、調製した脂肪乳剤とモチリンアナログの混合溶液 (薬剤組成物) を生理食塩水により希釈して同様に脂肪乳剤に吸着したモチリンアナログ量を求めた。結果は図 4 及び 5 に示されており、脂肪乳剤へのモチリンアナログの吸着量即ち脂肪乳剤からのモチリンアナログの放出量は脂肪乳剤の量及び脂肪乳剤中の電荷調整剤含量により制御できることが判明した。

【0020】製造例を兼ねる試験例 4 (酵素に対する安定性評価試験①)

試験例 2 において使用した処方 B の脂肪乳剤を使用し、pH 7.0、イオン強度 0.01 で成分最終濃度が 2% 脂肪乳剤及び 100  $\mu$ g/ml モチリンアナログ (製造例 1 に記載の [Leu<sup>27</sup>]-motilin-Hse) である薬剤組成物を調製した。 $\alpha$ -キモトリプシン (牛脾由来) を磷酸緩衝液 (pH 7.8) に溶解し、2  $\mu$ g/ml (0.106 IU/ml) 及び 500  $\mu$ g/ml (26.4 IU/ml) の  $\alpha$ -キモトリプシン溶液を調製した。又、トリプシン (牛脾由来) を磷酸緩衝液 (pH 7.8) に溶解し、0.46  $\mu$ g/ml (6.8 IU/ml) 及び 370  $\mu$ g/ml (3398 IU/ml) のトリプシン溶液を調製した。モチリンアナログと脂肪乳剤との混合組成物 (薬剤組成物) と、各種酵素溶液を等量混合し、37°C にてインキュベーション

\* ョンし、経時的に採取してモチリンアナログの残存量を定量した。又、脂肪乳剤を含まない 100  $\mu$ g/ml モチリンアナログ水溶液について同様に操作し、対照とした。結果は下記の表 4 及び 5 並びに図 6、7、8 及び 9 に示されている通りであり、分解反応が酵素濃度に比例するものと仮定した場合に、モチリンアナログ水溶液と比較してモチリンアナログと脂肪乳剤との混合組成物はキモトリプシンに関しては約 2000 倍、トリプシンでは約 5000 倍安定であった。

【0021】

【表 4】

検 体	酵素濃度	分解速度定数 ( $\text{min}^{-1}$ )	分解速度比
水溶液	1 $\mu$ g/ml	$2.47 \times 10^{-2}$ (0.982)*	1
混合組成物	250 $\mu$ g/ml	$3.05 \times 10^{-3}$ (0.982)*	1/2025

上記の表 4 はキモトリプシンによるモチリンアナログの分解を示しており、

\* : 一次反応速度式における相関係数である。

【0022】

※ ※ 【表 5】

検 体	酵素濃度	分解速度定数 ( $\text{min}^{-1}$ )	分解速度比
水溶液	0.38 $\mu$ g/ml	$2.73 \times 10^{-2}$ (0.995)*	1
混合組成物	185 $\mu$ g/ml	$2.77 \times 10^{-3}$ (0.994)*	1/4925

上記の表 5 はトリプシンによるモチリンアナログの分解を示しており、

\* : 一次反応速度式における相関係数である。

【0023】製造例を兼ねる試験例 5 (酵素安定性評価試験②)

モルモット気管支洗浄液 (BAL 液) に対する VIP アナログ (製造例 3 に記載の [Leu<sup>27</sup>]-VIP-Hse) ・ヘキシルアミドと脂肪乳剤とからなる組成物の安定性を評価した。即ち、Hartley 系雄性モルモット (6 週令、体重約 300g) にウレタン麻酔を施した後に気管を露出させ、生理食塩水 4ml を気管より徐々に注入する。注入した液を気管より回収し、BAL 液とした (BAL 液は -80°C にて保存した)。水素添加大豆ホスファチジルコリン 0.4g 及びジミリスチルホスファチジルグリセロール (ナトリウム塩) 1.6g であること以外は試験例 2 において言及の処方 B と同じである処方 C の脂肪乳剤を調製した。処方 B 及び C の脂肪乳剤を使用し、各種成分濃度がそれぞれ VIP アナログ ・ヘキシルアミド 200  $\mu$ g/ml、Tris-HCl (pH 7.8) 0.05M、脂肪乳剤 0.4 % BA

L 液 70% (V/V) になる組成物 (検体 B 及び C) を調製し、37°C にてインキュベーションし、経時的に採取して VIP アナログ ・ヘキシルアミドの残存量を定量した。尚、脂肪乳剤を含まないものについても上記と同様に操作して対照とした。結果は下記の表 6 及び図 10 に示されている通りであり、処方 B の脂肪乳剤を用いると、VIP アナログ ・ヘキシルアミド単独の場合 (対照) と比較して約 3.5 倍の分解半減期の延長が認められ、処方 C の脂肪乳剤を用いた場合には VIP アナログ ・ヘキシルアミドの分解は認められなかった。これらのことは、VIP アナログ ・ヘキシルアミドを電荷調整脂肪乳剤と結合させることにより該ペプチド誘導体の対酵素安定性が著しく向上することを実証している。

【0024】

【表 6】

被 験 物	分解速度定数 (hr <sup>-1</sup> )	分 解 半 減 期	
		(hr)	比
対 照	0.095 (0.994)*	7.3	1.0
検 体 B	0.027 (0.944)*	25.2	3.5
検 体 C	分解は認められない		

表 6 中において、\* : 一次反応速度式における相関係数

## 【0025】製造例を兼ねる試験例 6

ヒスタミンによる気管支平滑筋収縮に対する VIP アナログの弛緩作用をKonzett-Roessler 法により評価した。ジミリストイルホスファチジルグリセロール (ナトリウム塩) を 2.0g 用い且つ水素添加大豆ホスファチジルコリンを用いないこと以外は試験例 5 において言及した処方 B 及び C と同じである処方 D の脂肪乳剤を調製した。又、ジミリストイルホスファチジルグリセロール (ナトリウム塩) をジバルミトイルホスファチジルグリセロール (ナトリウム塩) に代替した以外は上記の処方 D と同じである処方 E の脂肪乳剤を調製した。電荷調整割合の異なる各種の脂肪乳剤を使用し、成分最終濃度が 2% 脂肪乳剤、100 $\mu$ g/ml VIP アナログ・ヘキシルアミドである組成物 (検体 D 及び E) を調製し、又処方 B 及び C の脂肪乳剤を用いて調製された組成物 (検体 B 及び C) について、VIP アナログ (製造例 3) \*

## ⑨投与スケジュール

	10分	9分	1分	9分	1分	9分	1分	9分	1分	→
	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	
St-His										
被験物										
Suc										
His										
Suc										
His										
Suc										
His										

⑨試験結果の処理 : 下記の式に基づいて抑制率を算出  
抑制率 (%) =  $[1 - (\text{His による経時的なピーク高} / \text{St-His のピーク高})] \times 100$

結果は下記の表 7 及び図 11 に示されている通りであり、VIP アナログを脂肪乳剤との組成物にすることによ※

\* に記載の [Leu<sup>17</sup>]-VIP-Hse)・ヘキシルアミドとして 20  $\mu$ g/kg の用量にて評価を実施した。尚、脂肪乳剤を含有しないものについても同様に操作し対照とした。

【0026】評価方法は下記の通りである。

- ①動物 : Hartley 系雄性モルモット (4 週齢)
- ②麻酔 : ウレタン (1.5g/kg i.p.)
- ③人工呼吸 : 40 strokes/min (4 - 7ml/strokes)
- ④自発呼吸の防止 : 塩化サクシニルコリン (Suc) 1.2m g/kg i.v.
- ⑤惹起物質 : ヒスタミン (His) 5 $\mu$ g/kg i.v.
- ⑥手術方法及び処置 : 麻酔下で頸部を切開し、頸静脈に薬物ラインのカニューレを装着し、一方、気道に Konzett-Roessler 装置のトランスデューサー部へ接続させるラインのカニューレを装着する。
- ⑦器具への吸着防止 : 1% 硬化ヒマシ油により前処理

※り、単独投与の場合と比較して著しい作用持続時間の延長が達成された。

【0027】

【表 7】

被 験 物	検体 B	検体 C	検体 D	検体 E	対 照
ID <sub>50</sub>	34	151	210 以上	210 以上	29

表 7 中において、ID<sub>50</sub> : ヒスタミンによる気管支平滑筋収縮を 50% 抑制し得る時間 (分)

## 【0028】試験例 7

製造例を兼ねる試験例 6 において調製した処方 D の脂肪乳剤とウナギカルシトニン (4500 IU/mg, PENINSULA LABORATORIES, INC. 製) とを混合し、最終成分濃度 0.015% 脂肪乳剤、0.03 $\mu$ g/ml ウナギカルシトニンの組成物を調製し、検体とした。一方、ウナギカルシトニンを

0.1% BSA 含有 1% 酢酸ナトリウム溶液 (pH4.0) に溶解し、0.03 $\mu$ g/ml 及び 0.10 $\mu$ g/ml のウナギカルシトニン溶液を調製、対照とした。雄性ウィスター系ラット (日本 SLC、6 週齢、各 3 匹を使用) にエーテル麻酔下で、被験物 (検体又は対照) を頸静脈より急速注入し、経時的に採血、血清中のカルシウムをカルシウム測

定キット（カルシウム C テストワコー）にて定量し、血清中カルシウム低下率 - 時間曲線と血清中カルシウム低下率が 0 の直線に囲まれる面積を台形法により計算して生理活性の指標とした。結果は下記の表 8 及び図 12 に示されている通りであり、本発明による組成物\*

試料	検体	対 照	
用量 ( $\mu\text{g/ml/kg}$ )	0.03	0.03	0.10
活性 (%・hr)	70.9 $\pm$ 6.0	36.6 $\pm$ 7.4	74.0 $\pm$ 8.2

【0030】

【発明の効果】生理活性ペプチド、タンパク質又はこれらの誘導体のキャリアーとして、表面電荷が負に調整された脂肪乳剤が用いられる。その結果生理活性物質の活性が増強し、酵素に対する安定性が向上し、薬理効果の持続時間が延長する。

配列

Phe Val Pro Ile Phe Thr Try Gly Glu Leu Gln Arg Leu Gln Glu  
5 10 15  
Lys Glu Arg Asn Lys Gly Gln Hse  
20

配列番号 2 :

配列の長さ : 29

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Gly Asn Tyr Thr Lys Leu Arg Lys  
5 10 15  
Gln Leu Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Lys Ala Leu Lys Hse  
20 25

【図面の簡単な説明】

【図 1】油脂としてのスクワランと、乳化剤としての水素添加大豆ホスファチジルコリンと、電荷調整剤としてのジミリスチルホスファチジルグリセロール（ナトリウム塩）とを用いて調製された脂肪乳剤へのモチリンアナログの吸着率と pH 条件との関係を示すグラフである。

【図 2】図 1 に関連して言及した脂肪乳剤のツェータ電位と pH 条件との関係を示すグラフである。

【図 3】図 1 に関連して言及した組成の脂肪乳剤であって、電荷調整剤の含有量が異なる 2 種類の脂肪乳剤を用いた場合の、脂肪乳剤へのモチリンアナログの吸着量と水相中のモチリンアナログ濃度との関係を示すグラフである。

【図 4】図 3 に関連して言及した 1 方の脂肪乳剤を希釈し、該脂肪乳剤へのモチリンアナログの吸着率と希釈率との関係を示すグラフである。

\* はは同一用量の対照と比較する場合に約 2 倍活性が高く、この組成物の活性は約 3 倍用量の対照品と同等となることが判明した。

【0029】

【表 8】

※配列表

配列番号 1 :

配列の長さ : 23

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

★配列の種類 : ペプチド

他の情報 :

C 末端はヘキシルアミド化されていることができる

★

【図 5】図 3 に関連して言及した他方の脂肪乳剤を希釈し、該脂肪乳剤へのモチリンアナログの吸着率と希釈率との関係を示すグラフである。

【図 6】電荷調整脂肪乳剤に結合させたモチリンアナログ（本発明による組成物）とモチリンアナログ水溶液とに濃度  $1\mu\text{g/ml}$  のキモトリプシンを作用させ、モチリンアナログの経時的残存率を調べた結果を示すグラフである。

【図 7】図 6 と同様の、但しキモトリプシン濃度が  $250\mu\text{g/ml}$  の場合のグラフである。

【図 8】図 6 と同様の、但し濃度が  $0.38\mu\text{g/ml}$  のトリプシンを作用させた場合のグラフである。

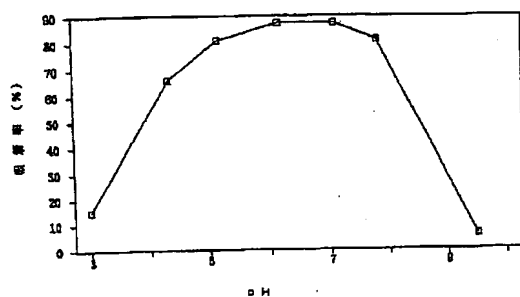
【図 9】図 8 と同様の、但しトリプシン濃度が  $185\mu\text{g/ml}$  の場合のグラフである。

【図 10】電荷調整脂肪乳剤に結合させた VIP アナログ（本発明による 2 種類の組成物）と VIP アナログ水溶液とにモルモット気管支洗浄液を作用させ、VIP アナログの経時的残存率を調べた結果を示すグラフである。

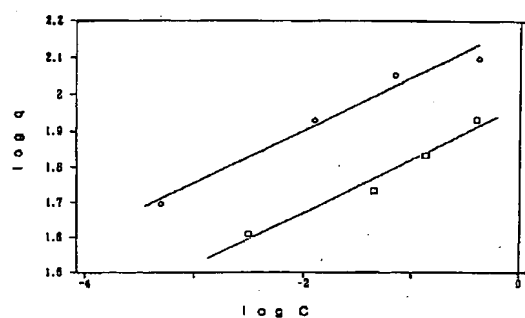
13

【図11】ヒスタミンによる気管支平滑筋収縮に対するVIPアナログ(VIPアナログ水溶液と、本発明による4種類のVIPアナログ組成物)の弛緩作用を調べた結果を示すグラフである。

【図1】

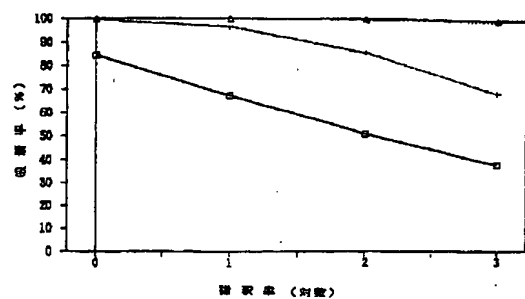


【図3】



- : 脂肪乳剤 (処方 A) + モチリンアナログ  
 $Y = 0.14945 X + 1.55828$   
 $R = 0.98147$   
 ◇ : 脂肪乳剤 (処方 B) + モチリンアナログ  
 $Y = 0.14512 X + 2.19746$   
 $R = 0.98582$

【図5】



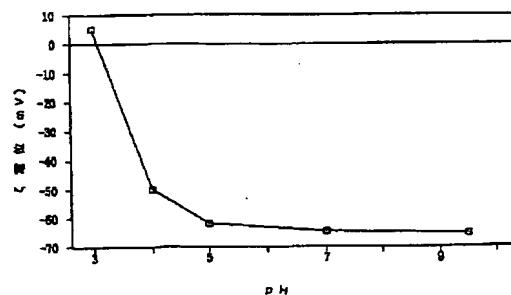
- : 脂肪乳剤 (処方 B, 0.1%) + モチリンアナログ  
 + : 脂肪乳剤 (処方 B, 0.2%) + モチリンアナログ  
 ◇ : 脂肪乳剤 (処方 B, 0.5%) + モチリンアナログ  
 △ : 脂肪乳剤 (処方 B, 1.0%) + モチリンアナログ

14

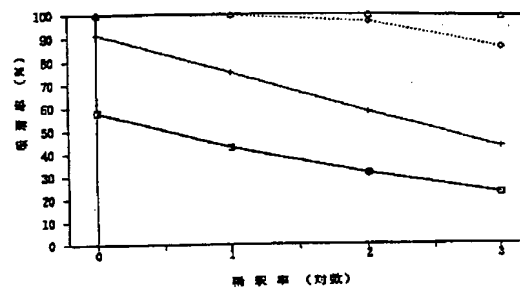
\* 果を示すグラフである。

【図12】ラットに対するウナギカルシトニンの血清カルシウム低下作用を調べた結果を示すグラフである。

【図2】

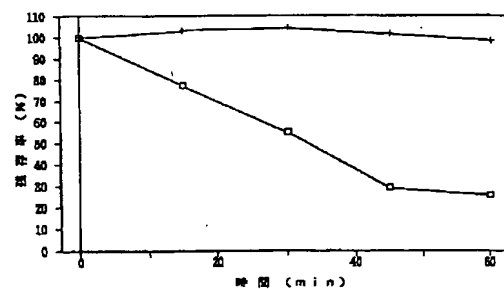


【図4】



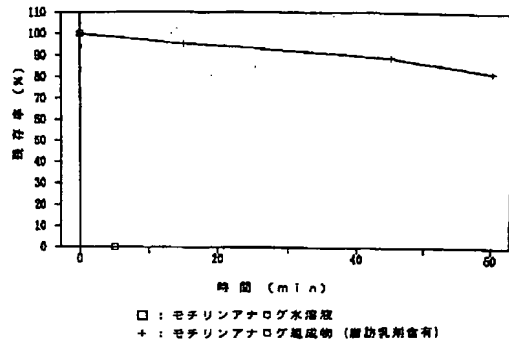
- : 脂肪乳剤 (処方 A, 0.1%) + モチリンアナログ  
 + : 脂肪乳剤 (処方 A, 0.2%) + モチリンアナログ  
 ◇ : 脂肪乳剤 (処方 A, 0.5%) + モチリンアナログ  
 △ : 脂肪乳剤 (処方 A, 1.0%) + モチリンアナログ

【図6】

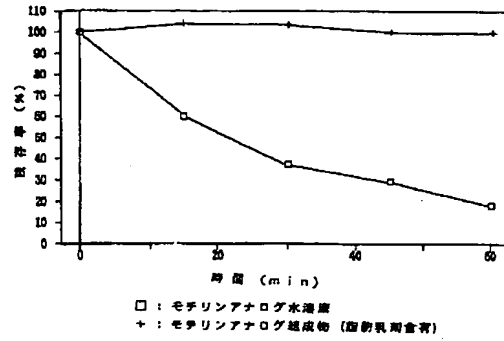


- : モチリンアナログ水溶液  
 + : モチリンアナログ組成物 (脂肪乳剤含有)

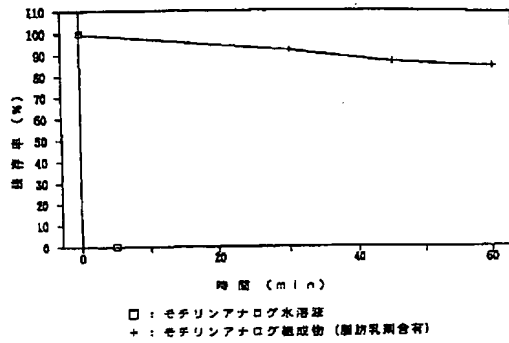
【図7】



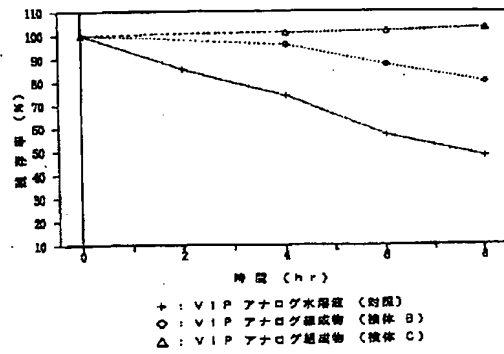
【図8】



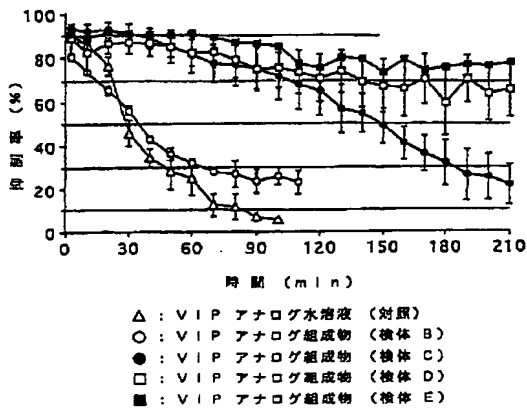
【図9】



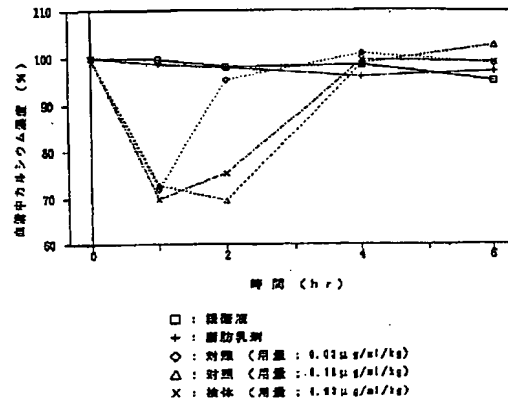
【図10】



【図11】



【図12】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 38/23				
47/12		H		
47/24		H		
47/28		H		
C 0 7 K 14/575	Z N A	8318-4H		
14/585		8318-4H		
14/63		8318-4H		

A 6 1 K 37/30

(72)発明者 吉名 重亮  
愛知県名古屋市東区東外堀町35番地 株式  
会社三和化学研究所内

(72)発明者 名越 正直  
愛知県名古屋市東区東外堀町35番地 株式  
会社三和化学研究所内

(72)発明者 前田 達志  
愛知県名古屋市東区東外堀町35番地 株式  
会社三和化学研究所内

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**